

RELACIÓN DE LOS CAMBIOS DEL METILOMA CON LA REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA EN CÉLULAS TUMORALES

Jesús Gómez Veas
jesus.gomez@e-campus.uab.cat
Proyecto de fin de grado



INTRODUCCIÓN

Es común que las células tumorales presenten modificaciones en su metiloma. Presentan hipometilación en general, pero hipermetilación en zonas concretas, llamadas islas CpG. Esta hipermetilación, llevada a cabo por las DNA metiltransferasas (DNMT) puede provocar el silenciamiento de un gen, si la isla CpG actúa como promotor de éste. Este silenciamiento puede afectar a, por ejemplo, genes supresores de tumores, evitando su transcripción, y por tanto, su efecto, facilitando la aparición de una célula tumoral. Los genes supresores de tumores son proteínas de control del ciclo celular, y permiten parar el ciclo si la célula no está en las condiciones óptimas para proliferar, pudiendo llevarla incluso a apoptosis. El silenciamiento génico parece darse por desacetilación de las histonas mediante la histona deacetilasa (HDAC), provocando la compactación del complejo DNA-histona. Este es uno de los patrones característicos que se dan en células tumorales. En este estudio, observaremos más a fondo este fenómeno.

HIPÓTESIS E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

En este estudio se pretende demostrar la hipótesis de que el silenciamiento génico en células tumorales está relacionado con mutaciones o sobreexpresión de las DNMT, y que ello, mediante HDAC y MBD, provoca la compactación del DNA y evita su transcripción. Este hecho puede ser vital para el desarrollo de un tumor, ya que los genes supresores de tumores comúnmente se ven afectados por este fenómeno. El hecho de descubrir este efecto, permitiría el estudio de nuevos tratamientos antitumorales, encargados de disminuir la expresión de las DNMT, en caso de encontrarse sobreexpresada, o bien la corrección del gen mutado mediante técnicas de terapia génica. Por tanto, abriría la posibilidad de una nueva terapia antitumoral, aspecto muy importante en el contexto social actual.

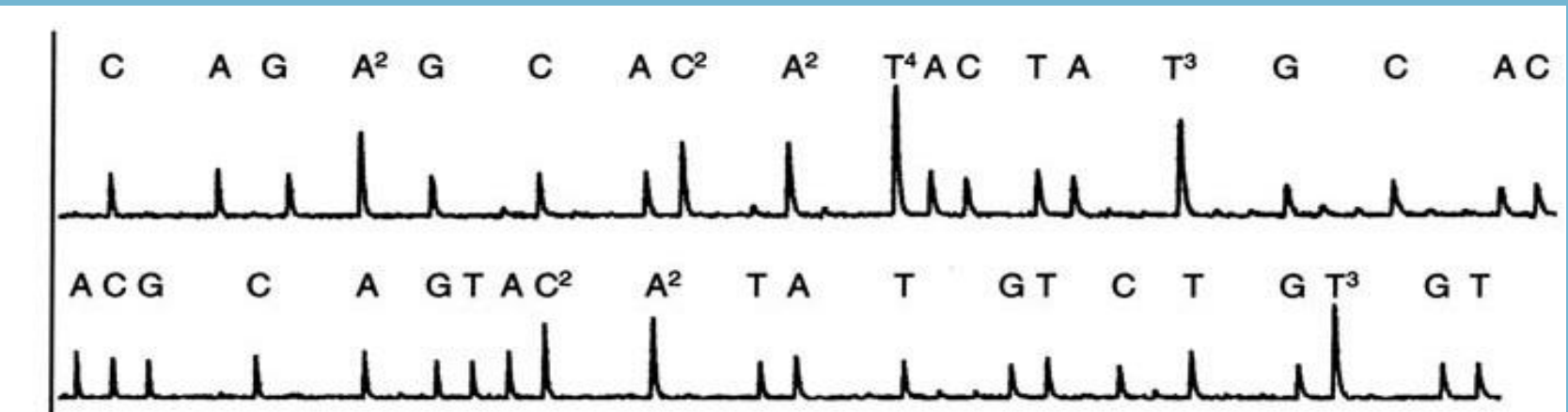
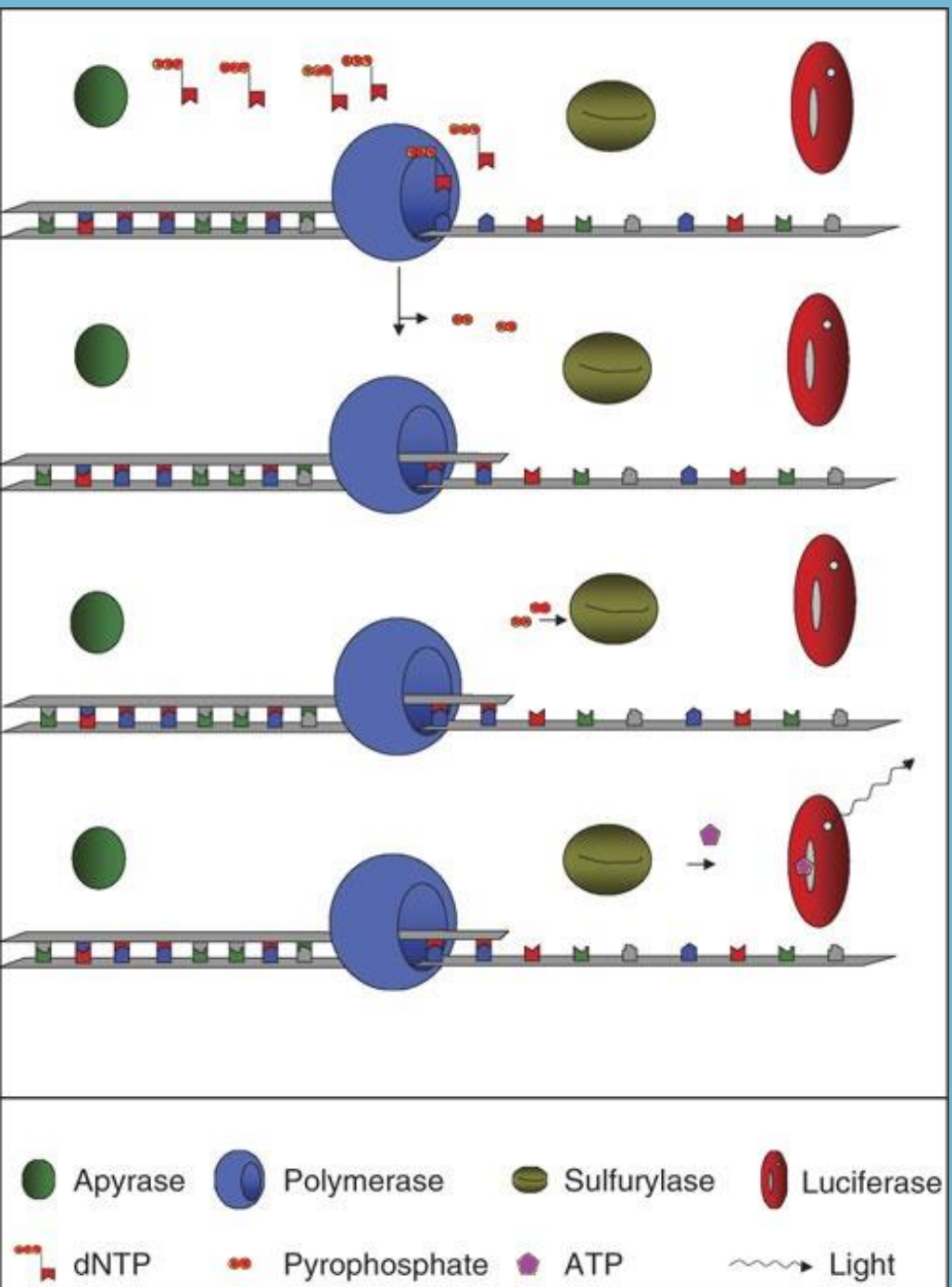
RESULTADOS

PIROSECUENCIACIÓN DEL GEN DNMT1, ESTUDIO DE SU SOBREEXPRESIÓN Y DE SUS POSIBLES MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Células utilizadas: HCT116 → Células de carcinoma colorrectal

Extracción y purificación DNA

Pirosecuenciación

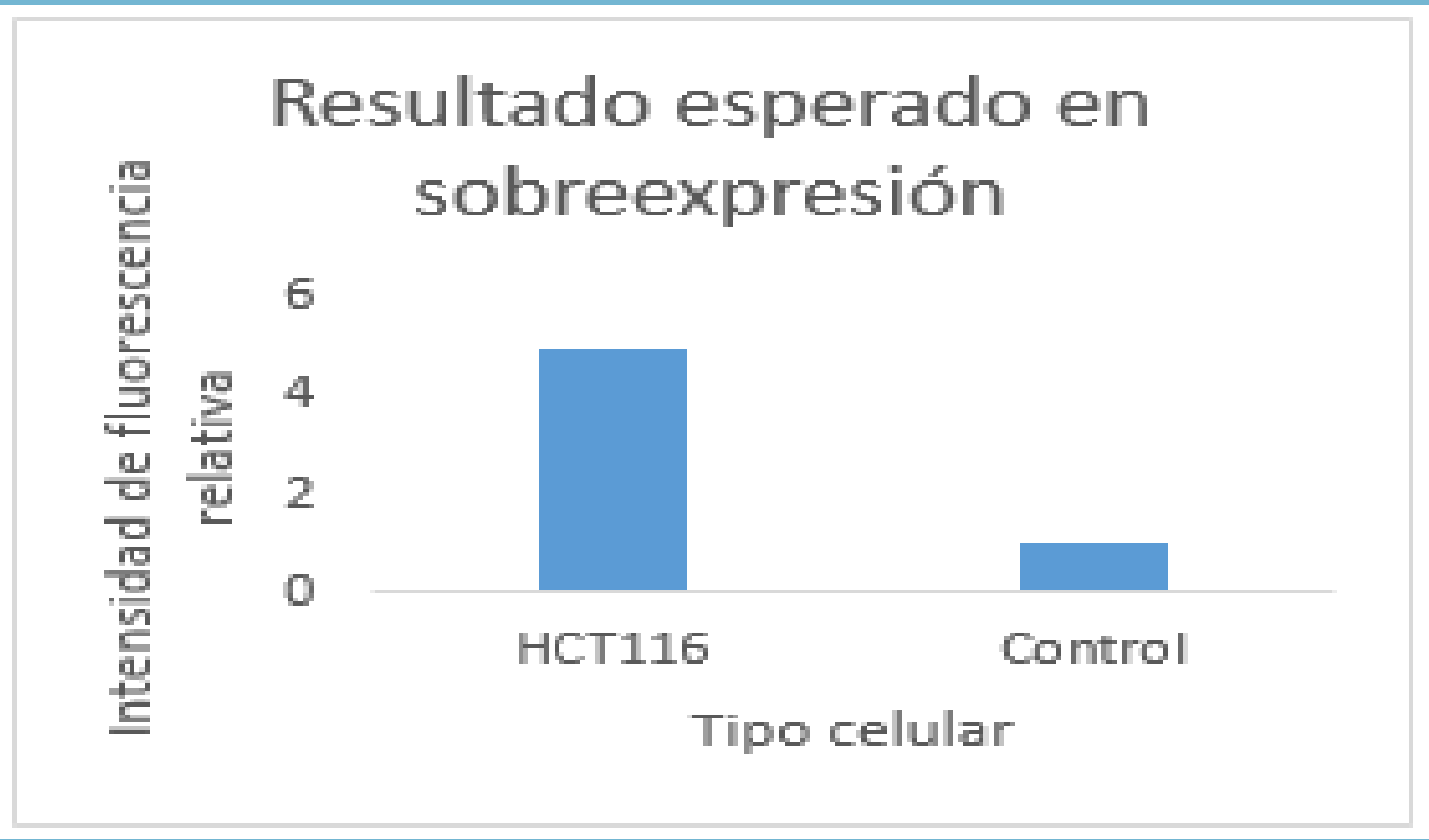


Esquema de la técnica de pirosecuenciación y prototipo de resultados. Imágenes editadas de [1] [2]

Análisis de expresión mediante RT-qPCR

Obtención y purificación RNA → Células HCT116

PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

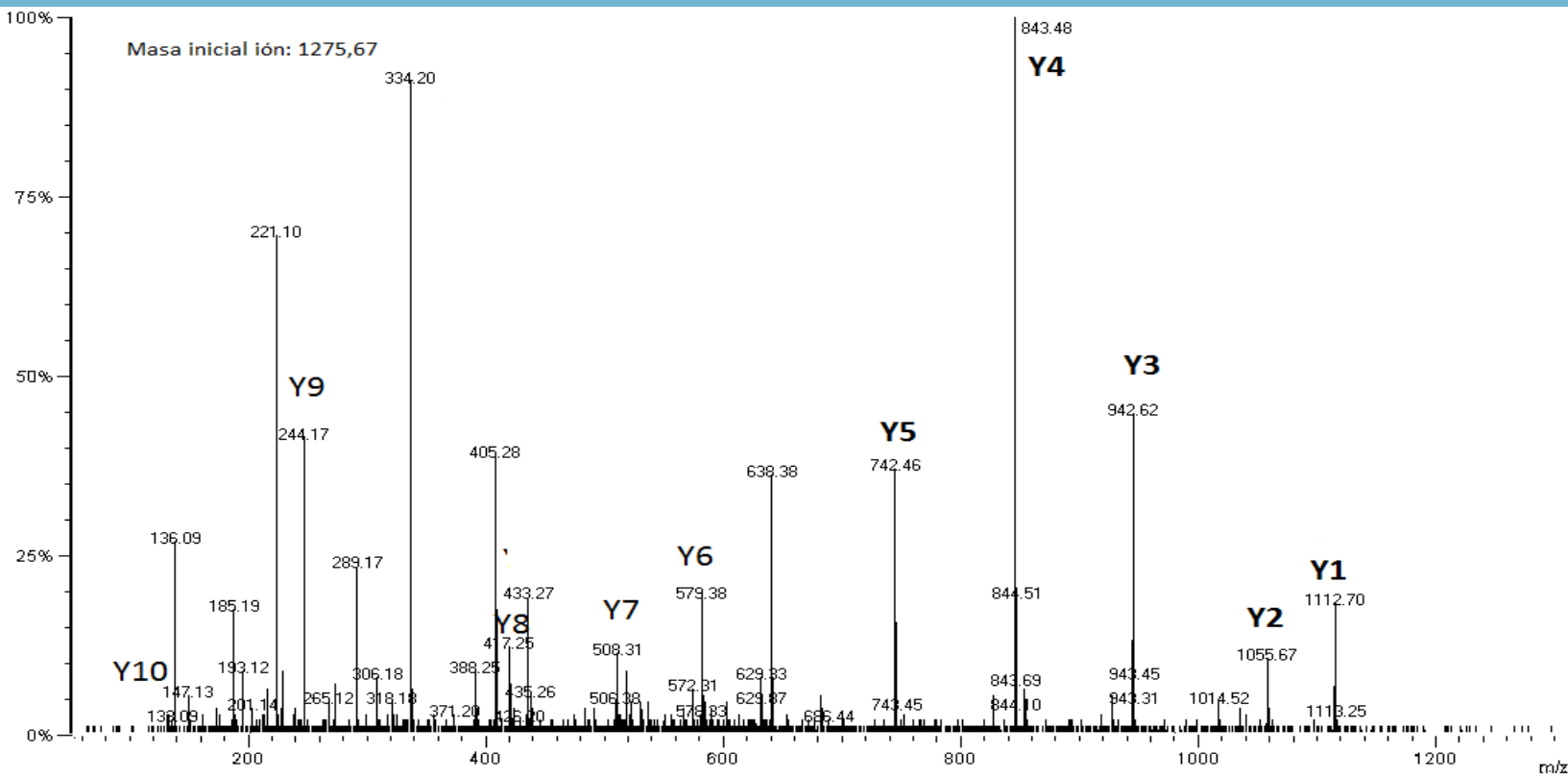


Resultados esperados en la RT-qPCR, en caso de sobreexpresión de DNMT1

Análisis de modificaciones postraduccionales mediante MS/MS

Obtención y purificación proteína de células HCT116

2 fases: Tripsinización + nanoelectrospray

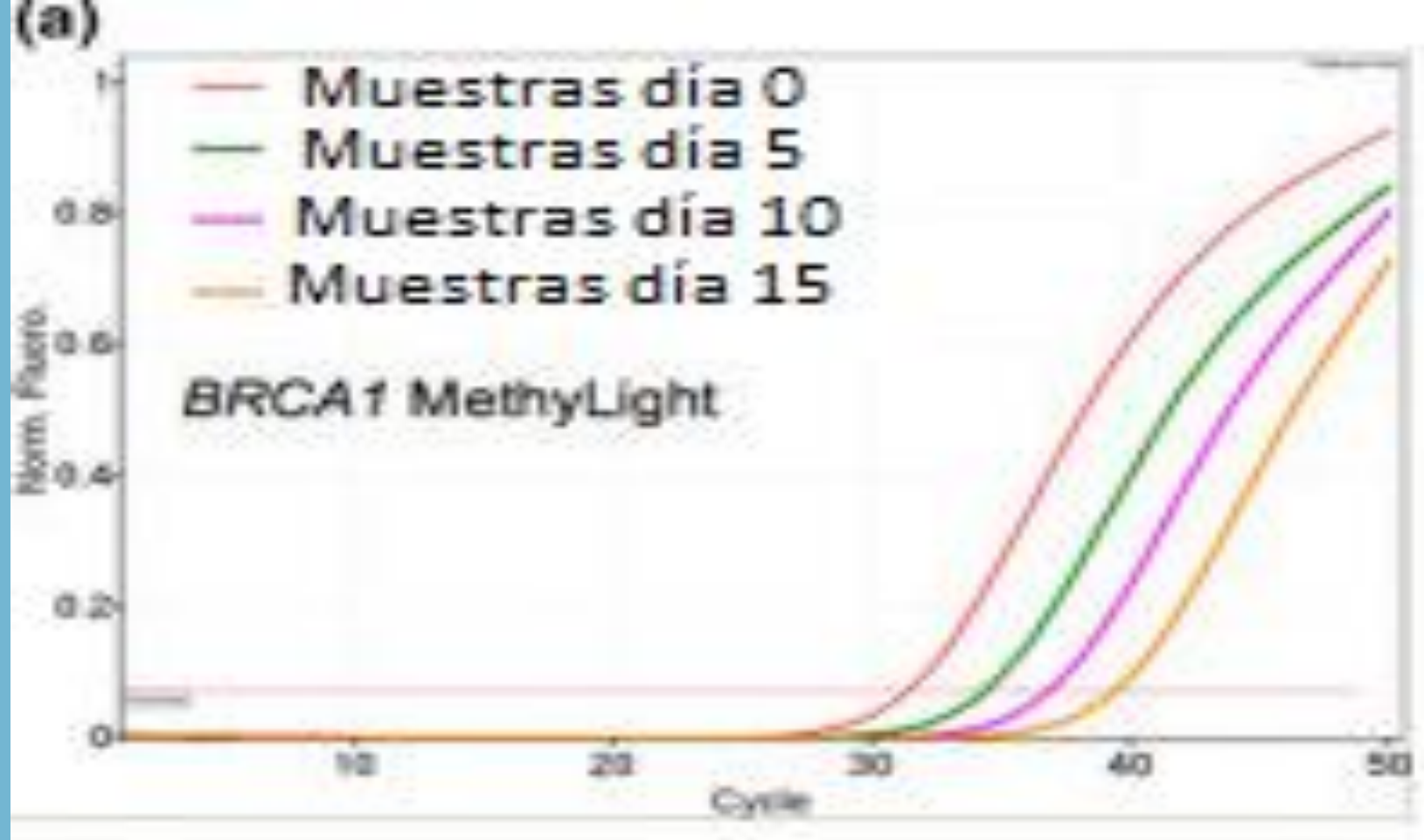


Prototipo de espectro obtenido por secuenciación de un péptido. Imagen editada de [3]

KNOCKDOWN DE LA DNMT Y ESTUDIO DE LA REGRESIÓN DEL TUMOR

Obtención de células a partir de biopsia de tumor mamario

Preparación células para realización de un xenograft en ratón

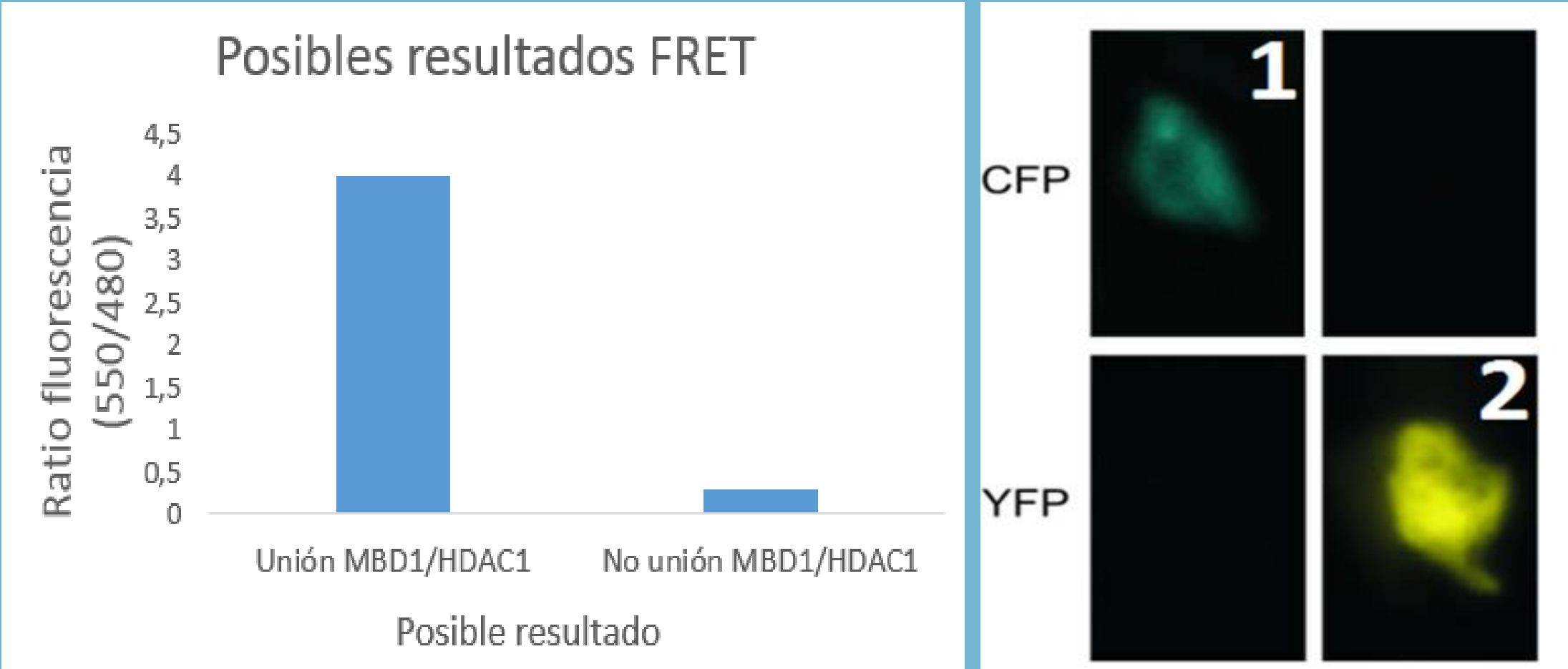


Prototipo de resultados de MethyLight. Imagen editada de [4]

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MBD1 Y HDAC1

Células utilizadas: HCT116. Estudio mediante FRET

Proteínas de fusión: MBD1-CFP y HDAC1-YFP



Prototipo de resultados del FRET. A la izquierda, vemos el ratio de fluorescencia en los 2 posibles casos. A la derecha, la fluorescencia de CFP e YFP. Imagen editada de [5]

Plan de trabajo

	Año 1		Año 2		Año 3	
	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 1	Semestre 2
Espectrometría de masas	X					
Pirosecuenciación	X					
RT-qPCR	X	X				
FRET			X			
Obtención muestras paciente de cáncer de mama		X				
Realización xenograft		X	X	X		
Estudio metiloma células del xenograft + Estudio tamaño del tumor				X	X	
Análisis de los resultados						X

REFERENCIAS

- [1]. Royo, J. L., Hidalgo, M., & Ruiz, A. (2007). Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping. *Nature Protocols*, 2(7), 1734–9.
- [2]. Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, Johansson B, Nyrén P. Typing of Human Papillomavirus by Pyrosequencing. *Lab Invest.* 2001;81(5):673-679.
- [3]. Wedd, N. (2007). Tandem Peptide Spectrum Interpretation. Retrieved from <http://www.weddslist.com/ms/tandem.html>
- [4]. Snell, C., Krypuy, M., Wong, E. M., Loughrey, M. B., & Dobrovic, A. (2008). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Research : BCR*, 10(1), R12.
- [5]. Bins AD, van Rhee J, Jalink K, et al. Intravital imaging of fluorescent markers and FRET probes by DNA tattooing. *BMC Biotechnol.* 2007;7:2.
- [6]. Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature.* 2002;416(6880):552-556.
- [7]. Kar S, Sengupta D, Deb M, et al. Expression profiling of DNA methylation-mediated epigenetic gene-silencing factors in breast cancer.